

学校编码: 10384  
学号: 32320131153386

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_  
UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**PM 2.5 对肺腺癌细胞 A549 的影响及其  
机制的初步研究**

**A Preliminary Study on The Effects and Mechanism of  
Exposure to PM 2.5 on A549 Cells**

倪 曼

指导教师姓名: 薛玉花 助理教授  
专 业 名 称: 化学生物学  
论文提交日期: 2016 年 4 月  
论文答辩时间: 2016 年 5 月  
学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_  
评 阅 人: \_\_\_\_\_

2016 年 5 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目 录

英文缩略词语对照表 .....	V
摘 要.....	VII
Abstract.....	VIII
第一章 前 言 .....	1
1.1 PM 2.5 概述.....	1
1.1.1 大气污染的分类与来源 .....	1
1.1.2 PM 2.5 的定义 .....	2
1.1.3 PM 2.5 形成因素 .....	2
1.1.4 PM 2.5 的成分 .....	3
1.1.5 PM 2.5 与疾病的关系 .....	5
1.2 真核基因转录调控.....	7
1.2.1 真核基因 RNA 聚合酶简介 .....	7
1.2.2 RNA 聚合酶 II 的结构 .....	7
1.2.3 RNA 聚合酶 II 调节的基因转录 .....	9
1.3 P-TEFb .....	10
1.3.1 P-TEFb 复合体的发现.....	10
1.3.2 P-TEFb 复合体的种类与功能.....	11
1.3.3 P-TEFb 复合体的正性调控.....	13
1.3.4 P-TEFb 复合体的负性调控.....	15
1.4 溴结构域蛋白-Brd4.....	16
1.5 立题背景 .....	17
第二章 实验材料与方法 .....	18
2.1 实验材料.....	18
2.1.1 细胞株 .....	18
2.1.2 实验主要试剂 .....	18
2.1.3 主要仪器和耗材 .....	19

2.1.4 主要溶液配方 .....	21
<b>2.2 实验方法 .....</b>	<b>26</b>
2.2.1 PM 2.5 样品制备 .....	26
2.2.2 细胞培养 .....	27
2.2.3 细胞增值实验 .....	28
2.2.4 全细胞裂解 .....	29
2.2.5 核抽提 .....	29
2.2.6 免疫共沉淀 .....	30
2.2.7 Total RNA 提取 .....	31
2.2.8 反转录 cDNA .....	31
2.2.9 qRT-PCR 反应 .....	32
2.2.10 流式细胞仪分析 .....	33
2.2.11 细胞迁移实验 .....	34
2.2.12 克隆形成实验 .....	36
<b>第三章 实验结果与分析 .....</b>	<b>37</b>
3.1 PM 2.5 对 A549 细胞增殖的影响 .....	37
3.2 PM 2.5 导致 A549 细胞周期阻滞 .....	38
3.3 PM 2.5 促进 A549 细胞凋亡 .....	39
3.4 PM 2.5 抑制 A549 细胞集落的形成 .....	41
3.5 PM 2.5 促进 A549 细胞迁移和侵袭 .....	41
3.6 PM 2.5 对 A549 细胞基因表达的影响 .....	43
3.6.1 PM 2.5 对 A549 细胞蛋白表达的影响 .....	43
3.6.2 PM 2.5 对 A549 细胞基因转录的影响 .....	44
3.7 PM 2.5 使细胞核中游离的 Brd4 减少 .....	45
3.8 PM 2.5 促进 7SK snRNP 的形成 .....	45
<b>第四章 讨 论 .....</b>	<b>47</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>50</b>
<b>致 谢 .....</b>	<b>56</b>

## Catalogue

<b>Abbreviation.....</b>	<b>V</b>
<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Chapter I Forwords.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Profiles of PM 2.5 .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Sources of atmospheric pollution .....	1
1.1.2 Definition of PM 2.5.....	2
1.1.3 Formation of PM 2.5 .....	2
1.1.4 Components of PM 2.5 .....	3
1.1.5 Relationship between PM 2.5 and disease.....	5
<b>1.2 Regulation of gene transcription in eukaryotes.....</b>	<b>7</b>
1.2.1 Profiles of RNA Polymerase in eukaryotes.....	7
1.2.2 Structure of RNA Pol II.....	7
1.2.3 Transcription mediated by RNA Pol II in eukaryotes .....	9
<b>1.3 Positive transcription elongation factor b (P-TEFb) .....</b>	<b>10</b>
1.3.1 Discovery of P-TEFb.....	10
1.3.2 Composition and fuction of P-TEFb .....	11
1.3.3 Positive regulation of P-TEFb .....	13
1.3.4 Negative regulation of P-TEFb.....	15
<b>1.4 Bromodomain-containingprotein-Brd4 .....</b>	<b>16</b>
<b>1.5 Background.....</b>	<b>17</b>
<b>Chapter II Materials and methods.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Materials .....</b>	<b>18</b>
2.1.1 Cell line.....	18
2.1.2 Reagents.....	18
2.1.3 Appratus.....	19
2.1.4 Solution.....	21

<b>2.2 Methods</b> .....	<b>26</b>
2.2.1 Sample Preparation of PM 2.5.....	26
2.2.2 Cell culture .....	27
2.2.3 Cell proliferation assay.....	28
2.2.4 Preparation of whole cell lysis.....	29
2.2.5 Nuclear extract.....	29
2.2.6 Co-immunoprecipitation purification .....	30
2.2.7 Total RNA extraction .....	31
2.2.8 Reverse transcrip to cDNA.....	31
2.2.9 Real-time quantative PCR .....	32
2.2.10 Flow cytometry analysis.....	33
2.2.11 Cell migration assay .....	34
2.2.12 Colony formation assay .....	36
<b>Chapter III Result and analysis</b> .....	<b>37</b>
3.1 The function of PM 2.5 on A549 cells in proliferation.....	37
3.2 PM 2.5 inhibits A549 cell cycle progression.....	38
3.3 PM 2.5 promotes A549 cell apoptosis .....	39
3.4 PM 2.5 inhibits the formation of A549 cell colony .....	41
3.5 PM 2.5 promotes A549 cell migration and invasion .....	41
3.6 Influence of PM 2.5 on gene expression in A549 cells.....	43
3.6.1 Influence of PM 2.5 on protein expression in A549 cells .....	43
3.6.2 Influence of PM 2.5 on gene transcription in A549 cells.....	44
3.7 Free Brd4 in nuclear extract is downregulated by PM 2.5.....	45
3.8 PM 2.5 promotes the formation of 7SK snRNP.....	45
<b>Chapter IV Discussion</b> .....	<b>47</b>
<b>References</b> .....	<b>50</b>
<b>Acknowledgement</b> .....	<b>56</b>

## 英文缩略词语对照表

Abbreviation	Full Name
ISO	International Standardization Organization
TSP	Total Suspended Particulates
PM	Particulate Matter
PM 10	Particles with diameters of 10 $\mu\text{m}$ or less
PM 2.5	Particles with diameters of 2.5 $\mu\text{m}$ or less
VOCs	Volatile Organic Compounds Head Space
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbon
WSPE	Water-soluble PM 2.5 extracts
EPA	Environmental Protection Agency
DEP	Diesel Exhaust Particles
WHO	World Health Organization
IARC	the International Agency for Research on Cancer
Pol II	RNA Polymerase II
CTD	C-terminal domain
TBP	TATA-binding protein
TAF	TATA-associated factor
P-TEFb	Positive transcriptional elongation factor b



---

CDK9	Cyclin dependent kinase 9
DRB	Daunorubicin
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
Tat	HIV-1-encoded transactivating protein
HEXIM1	HMBA inducible protein 1
LARP7	La ribonucleoprotein domain family, member-7
MePCE	S-adenosylmethionine-dependent methylphosphate capping enzyme
7SK snRNP	7SK small nuclear ribonucleoprotein, HEXIM1/7SK/LARP7/MePCE/P-TEFb
SEC	Super elongation complex, AFF1/4、ELL2、ENL/AF9、P-TEFb
BET	Bromodomains and extraterminal
Brd4	Bromodomain-containing protein 4
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition
ROS	Reactive Oxygen Species

---

## 摘要

近年来,随着国内能源产业与制造业等行业的崛起以及机动车保有量的增加,空气污染物 PM 2.5 的排放量急剧上升。表面吸附有大量有毒致癌物质的 PM 2.5 可通过呼吸作用进入呼吸道深处,沉积于肺泡表面,也可穿过肺泡进入血液循环系统进而影响其他器官的功能。有研究数据表明,长期暴露于 PM 2.5 可导致胚胎发育缺陷、心血管疾病发作、加重哮喘与肺功能损伤并引发肺癌等危害。肺癌是一种发病率很高的肿瘤疾病,人类长期暴露于高浓度的 PM 2.5 也会使肺癌的致死率增加。

本文主要研究了 PM 2.5 对人肺腺癌细胞 A549 增殖和基因转录延伸的作用与机制。MTT 实验结果表明 PM 2.5 可以抑制 A549 细胞以及其他多种细胞的增殖,流式结果显示 PM 2.5 可引起 A549 细胞凋亡和细胞周期阻滞。划痕实验和 Transwell 实验表明 PM 2.5 可以促进肺癌细胞的迁移和侵袭,这也说明了 PM 2.5 可导致肺癌恶化的原因。P-TEFb 是由 CDK9 和 Cyclin T 组成的正性转录延伸因子,它可通过磷酸化 Pol II Ser2 以及负性转录因子 NELF 和 DSIF 的 Spt5 亚基进而促进基因转录延伸。Western Blot 结果显示 PM 2.5 使 Pol II Ser2 与 Spt5 的磷酸化水平下降,说明 P-TEFb 的磷酸化活性受到了抑制。Brd4 和 HEXIM1 是 P-TEFb 的主要调节因子。Brd4 可以募集游离的 P-TEFb 至染色质从而促进转录延伸;P-TEFb 与 HEXIM1、LARP7 和 MePCE 等组成无转录活性的 7SK snRNP 复合体。核抽提结果中显示细胞核中游离的 Brd4 减少,IP 结果显示 P-TEFb 与 HEXIM1、LARP7 和 MePCE 的结合增多,表明 P-TEFb 由与 Brd4 组成的复合体向 7SK snRNP 复合体转化,这样转录延伸势必会受到抑制,qRT-PCR 数据分析得知 Brd4 下游基因如 C-myc 等的 mRNA 含量减少也证实了这一结果。PM 2.5 引起的多种组蛋白修饰的变化可能也与基因转录活性降低以及肺癌细胞迁移能力增强有关。综上所述,本研究证明了 PM 2.5 可抑制 A549 细胞增殖,促进 A549 细胞上皮间质转化,而且 PM 2.5 可影响基因转录的起始与延伸步骤,使 P-TEFb 向非活化状态转化,致使细胞整体基因转录水平的下降,最终导致 A549 细胞增殖的减慢。

**关键词:** PM 2.5; 肺癌; P-TEFb; Brd4; HEXIM1

## Abstract

For the past decades, emissions of air pollutants PM 2.5 sharply increased with the rise of domestic energy industry, manufacturing industry and vehicle population. Numerous of toxic carcinogenic substances stick to the surface of PM 2.5, which can be deep into the respiratory tract by respiration and deposit on the alveolar surface or even pass through the alveoli to involve the blood circulatory system thereby affecting the function of other organs. Studies have indicated that long-term exposure to PM 2.5 can lead to embryonic development defects, cardiovascular disease attack, asthma exacerbations, pulmonary dysfunction and even lung cancer. Lung cancer is a high morbidity neoplastic disease. Long-term exposure to high concentrations of PM 2.5 will also increase in the mortality the lung cancer.

In this study, we described the effects and mechanism of PM 2.5 on A549 cells proliferation and gene transcription elongation. The MTT assay indicates that chronic exposure to PM 2.5 can inhibit A549 and multiple cells proliferation. We find that PM 2.5 induces cell cycle arrest and apoptosis. The effects of PM 2.5 on migration and invasion show in the wound healing assay and transwell assay indicate that PM 2.5 promotes epithelial mesenchymal transition of A549 cells, which could be the cause of PM 2.5 can lead to deterioration of lung cancer. P-TEFb is composed of CDK9 and its regulatory partner Cyclin T. P-TEFb functions by phosphorylating Ser2 within the CTD of Pol II and other two negative transcription elongation factors, DSIF and NELF. Our results show that phosphorylation of Pol II Ser2 and Spt5 are down regulated by PM 2.5, which means the phosphorylation activity of P-TEFb was inhibited. Brd4 and HEXIM1 are the two major regulators of P-TEFb. Brd4 functions to recruit P-TEFb to active promoter through its affinity to acetylated histones. The kinase inhibitor HEXIM1 and other auxiliary proteins, LARP7 and MePCE sequester P-TEFb into an inactive complex known as 7SK snRNP. We find that PM 2.5 decreases the free Brd4 in nuclear extract and up regulates the isolation of P-TEFb in 7SK snRNP complex. In

this case, transcription elongation bound to be suppressed, and the qRT-PCR analysis shows the reduction of Brd4 downstream genes such as C-myc mRNA levels also confirmed this conclusion. Multiple histone modifications changes caused by PM 2.5 may also decrease gene transcriptional activity and enhance the migration ability of A549 cells. All these evidences indicate that long-term exposure to PM 2.5 can inhibit cell proliferation and promote epithelial mesenchymal transition of A549 cells. PM 2.5 can also promote the conversion of activated P-TEFb to non-activated state to influence the elongation steps of gene transcription, that result in decreased overall cell gene transcription and then down-regulated cell proliferation.

**Key Words:** PM 2.5; Lung cancer; P-TEFb; Brd4; HEXIM

## 第一章 前言

### 1.1 PM 2.5 概述

#### 1.1.1 大气污染的分类与来源

空气污染即大气污染,指的是由于自然过程或者人类活动所产生的物质进入到大气当中,具有足够的浓度,存在足够的时间,且危害到环境以及人类正常生活与健康的现象<sup>[1]</sup>。

空气污染物主要包含颗粒物(PM)、一氧化碳(CO)、氮氧化物(NO<sub>x</sub>)、碳氢化合物(HC)、硫氧化物等。大气污染物按属性一般分为物理性、化学性和生物性三类。其中化学性污染物污染范围最广、种类最多。根据污染物在大气中的物理状态,可分为颗粒状态和气态两类存在形式。气态污染物按成分可分为硫氧化物、氮氧化物、碳氧化物、有机化合物、硫酸烟雾、光化学烟雾等。颗粒状污染物按物理性质分为粉尘、烟、雾、飞灰、黑烟等。

大气污染的主要来源有很多。工业生产是大气污染是重要来源之一,其中包含多种有害气体与烟尘。城市生活中的煤炭燃烧会释放大量有害气体造成大气污染,特别是冬季采暖时产生的废气通常会使污染地区烟雾弥漫,令人窒息。飞机、轮船、火车等以燃油为动力的运输工具产生的废气也是重要的大气污染物。城市中聚集着的大量的机动车也是重要的污染源之一,它们排放的废气可直接损害人的呼吸系统,造成严重的城市空气污染。

早期的大气污染,通常发生在城市、工业区等局部地区,在较短的时间内大气中污染物浓度就可显著增高,使人与动、植物受到伤害。近年来,由于钢铁、水泥、炼油石化等高污染产业以及遍布各地的无组织零散高危害产业数量的增加<sup>[2]</sup>,大气污染物排量急剧上升,致使我国空气质量整体恶化趋势明显,极端大气污染事件频繁发生。京津冀、珠三角、关中地区等城市经济带尤为显著,最典型且受影响最大的地区为京津冀区域,近期根据环保部发布的数月全国重点区域和74个城市空气质量状况月报显示,京津冀地区空气质量最差,平均达标天数比例为27.4%,低于全国水平,全国污染最严重的10个城市中,只京津冀地区就

占了8个。

### 1.1.2 PM 2.5 的定义

PM 2.5 是空气颗粒物污染中的一种。按颗粒物的粒径可以把颗粒物分为总悬浮颗粒物（TSP）与可吸入颗粒物（PM 10 和 PM 2.5）。TSP 是指空气动力直径小于或等于 100  $\mu\text{m}$  的颗粒物。PM 10 是指空气动力学直径小于或等于 10  $\mu\text{m}$  的颗粒物。PM 2.5 是指空气动力学直径小于或等于 2.5  $\mu\text{m}$  的颗粒物，也被称为可入肺颗粒物，其直径比人的发丝直径的 1/20 还要小。尽管 PM 2.5 含量只占地球大气中很少的一部分，它对空气质量和能见度的影响不容忽视<sup>[3]</sup>。

PM 2.5形成的细颗粒物气溶胶污染是雾霾天气的本质<sup>[4]</sup>。卫星测量数据显示，在中国人口密集地区的大气气溶胶含量比欧洲、美国东部等地区高出约10倍。近年来，我国有许多大中城市雾霾天数逐年增加，达到100~200d/a<sup>[5]</sup>，能见度可降低到1~2 km。目前频发的雾霾污染是京津冀地区最严重环境问题<sup>[2]</sup>。

### 1.1.3 PM 2.5 形成因素

PM 2.5的形成与交通、制造、能源等行业有关，产生的途径包括建筑施工过程中产生的颗粒物，城市废弃物燃烧，热电厂，室内生物质燃烧，做饭与吸烟等。PM 2.5的表面吸附了大量的有毒有害物质，包括有毒重金属、有机污染物、酸性氧化物、细菌和病毒等。

目前，化石燃料是主要能源，它包括煤和石油等，其中煤除了包含可燃烧物质外还含有吕土、硅酸盐等不易燃烧的物质，这些物质掺杂着未完全燃烧的元素碳所形成细颗粒物被排放到空气中，形成我们所说的“烟”<sup>[6]</sup>。

被广泛使用的汽车燃料如汽油、柴油是由可燃烧的烃类化合物组成，它们在氧气不充足的条件下燃烧产生的一氧化碳以及未完全燃烧所产生的分子碎片与有机分子即挥发性有机化合物（VOCs）被排放到空气中，PM 2.5中的有机碳成分就是由VOCs及其次生产物组成。汽车启动过程中产生的NO<sub>2</sub>是一种有毒气体，它与空气中的其他物质反应最终形成雾霾中的硝酸盐<sup>[6]</sup>。

### 1.1.4 PM 2.5 的成分

PM 2.5的化学成分十分复杂，其中主要包含有机碳、元素碳、硝酸盐、硫酸盐、铵盐和钠盐等。PM 2.5的毒性因其化学成分的不同而具有显著差异。因此，有研究人员在厦门城市郊区进行了PM 2.5采集，从样本中检测到了28种金属元素，5种非金属元素和16种多环芳香烃(PAHs)，并对其中水溶性PM 2.5提取物(WSPE)的化学成分进行了表征<sup>[7]</sup>(表1-1)。其中对金属的检测，尤其是对PM 2.5中重金属浓度的定量与确定PM 2.5对人体细胞的影响有重要关系<sup>[8]</sup>。从表1-1中可以看出，金属元素占WSPE成分的绝大多数，在重金属当中，Zn、Mn、As、Cr 和 Cu 的含量最为丰富。然而，大多数有机成分并没有在WSPE中检测到，说明无机物是WSPE中的主要成分，这也说明WSPE的毒性主要由其中的无机成分决定。

表 1-1 水溶性 PM 2.5 提取物中无机成分浓度

成分	浓度 (ng.m <sup>-3</sup> )	成分	浓度 (ng.m <sup>-3</sup> )	成分	浓度 (ng.m <sup>-3</sup> )
Ca	5478.60	As	45.55	Mo	4.05
Na	3362.28	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	26.85	Cd	2.48
Al	2198.77	Cr	23.48	Th	1.39
K	1508.60	Cu	19.81	Cl <sup>-</sup>	1.18
Fe	1164.53	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	11.67	Tl	1.06
Mg	994.84	V	7.61	Co	0.71
B	784.84	Se	6.63	U	0.37
Zn	779.44	Pb	6.02	Ag	0.33
P	81.35	Sb	5.98	Hg	0.23
Ba	74.45	Ni	5.22	Be	0.20
Mn	61.80	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4.85	F <sup>-</sup>	0.16

表1-2中是研究人员在北京市朝阳区距离车辆密集道路300 m处测得的数据，该采集位点汇集了废弃物、交通和建筑排放等污染因素的作用，可代表北京城区的普遍空气水平<sup>[9]</sup>。

表 1-2 每小时采得样品的 PM<sub>2.5</sub> 浓度与化学组成

	成分	平均浓度	标准差
	PM <sub>2.5</sub>	62.16	39.37
无机离子 ( $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ )	$\text{Cl}^-$	1.04	1.49
	$\text{NO}_3^-$	15.18	13.12
	$\text{SO}_4^{2-}$	14.80	14.53
	$\text{Na}^+$	0.36	0.69
	$\text{NH}_4^+$	8.90	9.51
	$\text{Mg}^{2+}$	0.06	0.05
碳组分 ( $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ )	OC	9.32	4.16
	EC	3.08	1.43
金属元素 ( $\text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$ )	K	713.3	406.7
	Ca	412.1	309.4
	Cr	4.1	7.7
	Mn	36.9	22.3
	Fe	654.4	343.6
	Ni	2.6	4.3
	Cu	32.0	45.6
	Zn	195.8	148.6
	As	13.4	12.1
	Se	5.0	4.1
	Ag	9.5	25.6
	Cd	7.5	6.2
	Ba	34.0	16.9
	Hg	1.6	1.0
	Pb	74.0	52.6
气态污染 ( $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ )	$\text{SO}_2$	6.65	5.65
	$\text{NH}_3$	24.54	9.80



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.